

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Plattform Besamung und Embryotransfer
(LeiterIn: A.o.-Prof. Dr.med.vet Christine Aurich (Dipl.ECAR))

**Bindungsfähigkeit caniner Spermatozoen nach Tiefgefrierung mit verschiedenen
Tiefkühlmedien**

Diplomarbeit
Zur Erlangung der Würde eines
Magister Medicinae Veterinariae
Der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Kludia Csendes

Wien, Dezember am 2020

Betreuerin: Ao. Univ. Prof. Dr. med. vet. Sabine Schäfer-Somi

Gutachter: Dr. med. vet. Auke Boersma

Widmung

Ich möchte einen herzlichen Dank an meine Betreuerin, Ao. Univ. Prof. Dr. med. vet. Sabine Schäfer-Somi, sagen, die mich aus vollem Herzen während der Anfertigung der Diplomarbeit unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank für meine Familie und Freunde, die mir das Studium ermöglicht haben und mit ihrer Hilfe konnte mein Traum wahr werden.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1. Aufbau der Spermienmembran	3
1.2. Kapazitation und Akrosomreaktion.....	4
1.3. Bindung der Spermien an die Oozytenmembran	5
1.3.1. Die Bindungsfähigkeit beeinflussende Faktoren	6
1.3.2. Überprüfung der Bindungsfähigkeit in vitro	6
2. Material und Methoden	8
2.1. Zona Binding Assay	10
2.1.1. Tiere	10
2.1.2. Oozytengewinnung	11
2.1.3. Spermiovorbereitung für den Zona Binding Assay.....	13
2.1.4. Durchführung des Zona Binding Assays.....	13
2.2. Statistik	16
3. Ergebnisse.....	17
4. Diskussion.....	19
5. Zusammenfassung.....	23
6. Summary	25
7. Literaturverzeichnis.....	27
8. Tabellen – und Abbildungsverzeichnis.....	34

Abkürzungen

BSA	Bovine Serum Albumin
CASA	Computer Assisted Sperm Analyser
Cat	Katalase
CCM	Canine Capacitation Medium
CRISP1	Cysteine-rich Secretory Protein 1
COCs	Cumulus-Oozyten-Komplexe
EYP	Egg Yolk Plasma
EY	Eigelb
Equ	Equex STM Paste
Glykoprotein ZP3	Zona Pellucida Glycoprotein 3
Glyc	Glycerol
P	progressive Motilität
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
PVA	Polyvinylalkohol
ROS	Reactive Oxygen species
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
sp56	Spermien Protein 56
TESP5	Testicular Serine Protease 5
VCL	Velocity Curvilinear

1. Einleitung und Fragestellung

Die Herstellung von Tiefkühlsamen dient verschiedenen Zwecken, die eine große Bedeutung in der heutigen Zucht haben. In den letzten Jahren wird immer mehr Tiefkühlsamen importiert und exportiert. Es ist einerseits wichtig für die Auffrischung und die Erweiterung des Genpools, andererseits bedeutet es weniger Belastung für die Tiere, weil die Transporte der Zuchttiere keine Notwendigkeit mehr darstellen. Außerdem ermöglicht die Herstellung von Tiefkühlsamen die künstliche Besamung mit auf Qualität und Hygiene kontrolliertem Samen. Ein weiterer Vorteil ist, dass Sperma, das kurz vor oder nach dem Tod gewonnen wurde, eingefroren werden kann, so dass die weitere Verwendung in der Zucht möglich ist.

Die Befruchtungsfähigkeit ist sehr unterschiedlich, je nach Samenqualität, die bei den Individuen unterschiedlich ist. Die Tiefkühl- und Auftaumethode sowie die Befruchtungsmethode haben auch einen Einfluss auf die Qualität. Die Trächtigkeitsrate ist höher bei intrauteriner Besamung als bei der intravaginalen Besamung (Thomassen et al. 2006). Außerdem sind die Verdüner, ihre Zusammensetzung, der pH-Wert und die Osmolarität, als wesentliche Faktoren zu erwähnen (Nizański et al. 2001, Schäfer-Somi et al. 2006, Thomassen et al. 2006).

Versuche, die Qualität des Tiefkühlsamens zu verbessern, erfolgten u. a. durch verschiedene Verdüner, membranschützende Substanzen und Antioxidantien (Bergeron et al. 2004, Michael et al. 2007, Axnér und Lagerson 2016, Corcini et al. 2016).

Eidotter wird als membranschützende Substanz seit Langem erfolgreich bei der Kryokonservierung der Spermien im Verdünner verwendet. Mittlerweile werden jedoch Alternativen zum Eidotter gesucht, weil die Zusammensetzung des Eidotters nicht konstant ist, außerdem muss bei der Verwendung eines Zusatzes tierischen Ursprungs mit hygienischen Problemen gerechnet werden (Bousseau et al. 1998).

In einer Studie wurde festgestellt, dass die kaninen Spermien, die mit Eigelbplasma im Verdünner eingefroren wurden, nach dem Auftauen eine bessere Qualität zeigten als jene, die mit eidotterhaltigem Verdünner eingefroren wurden (Corcini et al. 2016).

Lecithin wird ebenfalls als Zusatz oder Alternative zu Eidotter in Tiefkühlmedien intensiv erforscht, auch zur Kryokonservierung kaniner Spermien. Die Ergebnisse von Axnér und

Lagerson (2016) zeigten, dass der Verdünner auf TRIS-Basis mit 20 % Eidotter eine bessere Spermienqualität erzielte, als der Verdünner auf TRIS-Basis mit 1 % oder 2 % Lecithin. Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass Lecithinkonzentrationen über 1 % sich negativ auswirken können; in einer Studie konnte eine Absenkung der Motilität und der Lebensfähigkeit der aufgetauten Spermien festgestellt werden (Forouzanfar et al. 2010). Die Studie von Dalmazzo et al. (2018), in der niedrigere Lecithin-Konzentrationen verwendet wurden, ergab bessere Ergebnisse; bei dieser Lecithin Konzentration scheint Lecithin eine gute Alternative zum Eidotter zu sein.

Mit Hilfe von Antioxidantien können Kryokonservierungsschäden verringert werden. Die Beimischung von Antioxidantien dient der Bewahrung einer physiologischen Konzentration an reactive oxygen species (ROS) in den Samenproben. Dieses ist wichtig, da geringe Konzentrationen an ROS wesentlich an der Fertilisation beteiligt sind (Aitken et al. 1989, Griveau und Le Lannou 1997). In einer Studie von Michael et al. (2007) erwies sich Katalase, aus allen getesteten Antioxidantien, als der effektivste Zusatz.

In dieser Diplomarbeit, die einen Teil einer größeren Studie darstellt (Burak und Papadopoulos 2019), wurden drei Verdüner verwendet. Der Erste war ein Verdünner auf TRIS-Fructose-Zitronensäure Basis, mit Eidotter und Glycerol. Der Zweite war der gleiche Verdünner, aber statt Eidotter wurde Eigelbplasma verwendet (Corcini et al 2016). Der dritte Verdünner war ebenfalls auf TRIS-Fructose-Zitronensäure Basis, enthielt jedoch zusätzlich zum Eidotterplasma Lecithin und Glycerol. Als Antioxidans wurde jeweils Katalase verwendet.

Das Ziel der Studie von Burak und Papadopoulos (2019) war es zu untersuchen, ob Eidotterplasma in einem Tiefkühlverdünner das Eigelb ersetzen kann; weiters, ob die Qualität durch Zusatz von Lecithin und Katalase verbessert werden kann. Hierbei wurden die Parameter Kinetik, Morphologie, Membranintegrität, DNA-Fragmentation, Apoptose und ROS untersucht. Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte die in-vitro Bindungsfähigkeit der Samenzellen nach Verwendung der gleichen Tiefkühlmedien vergleichend untersucht werden. Hypothese war, dass die Bindungsfähigkeit durch Eidotterplasma nicht beeinträchtigt wird und durch Zusatz von Lecithin und Katalase verbessert werden kann.

1.1. Aufbau der Spermienmembran

Spermien sind, wie alle Zellen, von einer Zellmembran umgeben. Diese doppelschichtige Membran enthält Phospholipide, Cholesterol und Glykoproteine. Die Zellmembranen bestehen vor allem aus Phospholipiden, zwischen den Phospholipiden sind asymmetrisch angeordnet Cholesterolmoleküle zu finden. Außerdem ist Sphingomyelin, als häufigstes Sphingolipid, in großer Anzahl in den Membranen enthalten. Die Phospholipide bilden eine Doppellipidschicht, in der die hydrophilen Anteile nach außen orientiert sind und die hydrophoben Anteile nach innen. So entsteht die Grundstruktur der doppelten Zellmembran, die als Barriere gegenüber schädlichen Einflüssen dient, aber auch mit vielerlei wässrigen Komponenten interagieren kann. Die Fusion der Zellmembranen ist möglich und ein wesentlicher Prozess bei der Befruchtung, wobei die Zellmembran der Spermien mit jener der Oozyten fusioniert (Whited und Johs 2015).

Die Doppelbindungen innerhalb der Membran und der Cholesterolgehalt haben einen Einfluss auf die Konsistenz der Membran. Die Anzahl der Doppelbindungen beeinflusst die chemische Reaktivität, die wiederum die Motilität ändern kann. Cholesterol führt bei steigender Konzentration zur Erhöhung der Konsistenz der Membran. Außerdem beeinflusst Cholesterol die Permeabilität, die Membran wird durchlässiger.

In der Membran lokalisierte Proteine erfüllen Aufgaben als Rezeptoren, Strukturproteine, Ionenkanäle und als Enzyme (Chłopik und Wysokińska. 2020). Diese Proteine ermöglichen die Interaktion mit der Umgebung und mit anderen Membranen. Die elektrostatischen und hydrostatischen Kräfte, die zu einer Interaktion zwischen geladenen Proteinen und geladener Membran führen, sind wesentlich für die Bindung der Proteine an die Membranen. Die positiv geladenen Proteine werden von negativ geladenen Membranen angezogen (Mulgrew-Nesbitt et al. 2006), die danach auftretende, hydrophobische Interaktion ermöglicht die Bindung der Proteine. Die gebundenen Proteine können dann als Rezeptoren, Enzyme und Ionenkanäle dienen (Dathe et al. 1996). Die Proteine als Ionenkanäle ermöglichen eine Diffusion der Ionen bzw. eine hydrophile Passage durch die Membran. Die Membranrezeptoren sind spezielle Proteine, die äußere Signale erkennen können. Diese Signale können in Form von Neurotransmittern, Hormonen oder Arzneimitteln kommen.

1.2. Kapazitation und Akrosomreaktion

Kapazitation und Akrosomreaktion sind wesentliche Prozesse, die die Spermien befähigen, die Eizelle zu befruchten.

Die Kapazitation ist ein Destabilisierungsprozess der Plasmamembran, wodurch eine erhöhte Membranfluidität und Membranpermeabilität erreicht wird. Die durch Cholesterolfreisetzung erhöhte Durchlässigkeit der Plasmamembran führt zum Einstrom der Kalzium- und Bikarbonationen. Kalzium wird über die Kalziumkanäle und Bikarbonat über $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Pumpen in die Zelle transportiert. Dieser Prozess bedeutet gleichzeitig eine pH-Erhöhung, weil mehr Kalzium und Bikarbonat intrazellulär vorhanden ist.

Die Kapazitation kann zeitlich in zwei Abschnitte geteilt werden, der erste Teil verläuft schnell und der zweite langsamer. Beide spielen sich während der Wanderung im weiblichen Genitaltrakt ab. Nach der Ejakulation aus dem Epididymis beginnt der schnellere Abschnitt, der verantwortlich für die Flagellenbewegung ist. Diese wird durch Aktivierung von Protein-Kinase A nach dem Einstrom von Bikarbonat und Kalzium ermöglicht. Die Bewegung ist asymmetrisch aber kräftig. Danach zeigen die Spermien Hypermotilität, die durch Änderung der Linearität und Steigerung der Geschwindigkeit gekennzeichnet ist und mit Veränderungen in der Stoffwechselaktivität einhergeht. Die Hypermotilität beginnt mit der Freisetzung von Cholesterol (Demarco et al. 2003, Hernández-González et al. 2006, Arcelay et al. 2008).

Die Akrosomreaktion findet nach der Kapazitation statt, dieser Prozess ist unerlässlich für die Befruchtung der Eizelle. Während dieses im kranialen Pol des Spermienkopfes sich abspielenden Prozesses kommt es zur stellenweisen Fusion der Akrosommembran und der Plasmamembran. Anschließend fließt Kalzium durch Kanäle in der Membran in die Zelle ein. Dieser Kalziumeinstrom ist verantwortlich für die Exozytose der lytischen Enzyme. Die Akrosomreaktion kann in vitro durch das Glykoprotein ZP3 ausgelöst werden. Dieses Glykoprotein befindet sich in der Zona pellucida (Yanagimachi et al. 1974, Kawakami et al. 1993). Die Akrosomreaktion kann bei kaninen Spermatozoen auch mit Zona pellucida Antigen anderer Spezies ausgelöst werden (Kawakami et al. 1993).

Die Oozyten sind von einer Glykoproteinschicht umgeben, die von den Spermien enzymatisch zersetzt werden muss, um die Penetration zu ermöglichen. Im Rahmen der Akrosomreaktion

werden lytische Enzyme freigesetzt, die die Glykoproteinschicht auflösen, so dass die Spermien eindringen können, um später mit der Eizelle zu fusionieren (Vacquier und Moy. 1977, Ulrich et al. 1998).

1.3. Bindung der Spermien an die Oozytenmembran

Die Interaktion zwischen Spermien und Oozyten passiert an mehreren Stellen, diese Schritte sind vor der Befruchtung essentiell. Die Spermien müssen zuerst das Cumulus oophorus penetrieren, um die Zona pellucida zu erreichen. Dort wird die Akrosomreaktion induziert, wodurch die Fusion mit der Plasmamembran der Eizelle ermöglicht ist (Evans 1999).

Es wird vermutet, dass das Cumulus oophorus Botenstoffe entsendet, die den Spermien signalisieren, wo sich die ovulierte Eizelle befindet. Die Spermien wiederum entlassen während der Akrosomreaktion Enzyme, wie Zonadhesin und sp56, die für die Bindung an die Oozytenmembran verantwortlich sind. Während der darauf folgenden Penetration der Zona pellucida spielen weitere Enzyme, wie Akrosin und Testicular Serine Protease 5 (TESP5) eine Rolle. Das Äquatoriale Segment der Spermienmembran fusioniert mit der Plasmamembran der Eizelle. An diesem komplizierten Prozess sind viele Moleküle des Spermiums und der Oozyte beteiligt. Die Stoffe, die die wichtigste Funktion bei der Adhäsion haben, sind CD9, $\alpha\beta 1$ -Integrin und CRISP1. Die Fusionspore wird nach dieser Phase ausgebildet. Während der Vereinigung mit der Eizelle werden die Spermien von Mikrovilli unterstützt (Cho et al. 1998, Ikawa et al. 2001, Nishimura et al. 2004, Yamaguchi et al. 2009).

1.3.1. Die Bindungsfähigkeit beeinflussende Faktoren

Die Bindungsfähigkeit der Spermien kann von vielen Faktoren negativ oder positiv beeinflusst werden. Bei der Kryokonservierung und dem nachfolgenden Auftauen können Membran- und Akrosomschäden auftreten, außerdem kann beides eine negative Wirkung auf die Morphologie und Motilität haben (Rodriguez-Martinez et al. 1993). Diese Schäden führen zu einer verminderten Bindungsfähigkeit. Antioxidantien und Tiefkühlverdünner sollen die Spermien vor Schäden durch Kryokonservierung schützen. Als kryoprotektive Substanzen werden unter anderem Eidotter oder Eidotter-Plasma (Egg Yolk Plasma, EYP) dem Verdünner zugesetzt. Diese haben einen positiven Effekt auf die Membran- und Akrosomenintegrität. Beide enthalten Low Density-Lipoproteine, welche mit den Seminalplasma-Proteinen Komplexe bilden können. Diese Interaktion führt im Endeffekt zu einer besseren Membranstabilität, wodurch auch die Widerstandsfähigkeit der Spermien gegenüber Kryokonservierungsschäden verbessert wird (Bergeron et al. 2004).

Nach Kryokonservierung werden erhöhte ROS Konzentrationen in den Samenproben messbar (Chatterjee und Gagnon 2001). Zu viele freie Sauerstoffradikale wiederum können unter anderem zu einer Schädigung der Spermienmembran führen (Alvarez und Storey 1995). Zusätzlich wurden mitochondriale Schädigung, gesteigerte Lipidperoxidation, erhöhte DNA-Fragmentation und Zunahme der Schädigung der Plasma- und Akrosomenmembran festgestellt (Sawyer et al. 2003, Vieira et al. 2018). Diese Schädigungen führen wiederum zu einer verminderten Bindungsfähigkeit.

1.3.2. Überprüfung der Bindungsfähigkeit in-vitro

In-vitro ist die Untersuchung der Befruchtungsfähigkeit mit Hilfe des Zona binding assay (ZBA) und des Zona Penetration Assay (ZPA) möglich. Beide ermöglichen eine Aussage über die Interaktion zwischen Spermien und Oozyten. Der ZBA ermöglicht in Kombination mit der Morphologie und der Motilität eine relativ gute Prognose der Befruchtungsfähigkeit (Kaskar et al. 1994, Hermansson et al. 2006).

Beim ZBA muss beachtet werden, dass die Qualität der Oozyten einen signifikanten Einfluss auf die Bindung hat. Schlechte Qualität der Oozyten kann die Interpretation des Ergebnisses

verfälschen (Mahadevan et al. 1987, Mayenco-Aguirre und Pérez Cortés 1998). In einer Studie wurden viele Oozyten aus Eierstöcken gewonnen, die wegen einer Pyometra entfernt wurden (Hermansson et al. 2006). Es wurde jedoch in einer anderen Studie festgestellt, dass die Oozyten aus Eierstöcken, die in Rahmen einer Ovariohysterektomie wegen Pyometra entfernt wurden, auch erfolgreich *in vitro* maturiert werden können (Hishinuma et al. 2004). Die mikroskopische Beurteilung nach der Gewinnung ist ausschlaggebend. Die unterschiedliche Bindungsfähigkeit der Oozyten kann auch durch unterschiedliche Veränderung der Glykoproteinschicht während der Maturation bedingt sein (Mahadevan et al. 1987).

Der andere wesentliche Faktor ist die Qualität der Spermien. Samenzellen aus Frischsamen zeigen *in vitro* eine deutlich höhere Bindungsfähigkeit im Vergleich zu gekühltem oder Tiefgefriersamen, da unter anderem Motilität, Membranintegrität und Akrosomintegrität besser sind als bei gekühltem oder Tiefgefriersamen (Hermansson et al. 2006). Die Zonabindungskapazität der Tiefgefriersamen ist vor allem deswegen reduziert, weil die Tiefgefrierung einen negativen Effekt auf diese Parameter hat (Ivanova et al. 1999).

Die Inkubationszeit der Spermien im canine capacitation medium (CCM) sollte auch einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der Spermien haben. In einer Studie wurde die Bindungsfähigkeit aufgetauten Tiefgefriersamens mittels ZBA nach 2, 8 und 24 Stunden Inkubationsperiode in CCM überprüft. Die Spermien, die 2 Stunden in CCM inkubiert wurden, haben das beste Ergebnis gezeigt.

Wenn die Inkubationszeit von 2 auf 8 Stunden verlängert wurde, führte dies zu einer Reduktion der Bindung an die Zona pellucida um 50 %, obwohl Motilität und Lebensfähigkeit nur um 10-15 % reduziert waren. Nach 24 Stunden Inkubation in CCM war sowohl die Anzahl der gebundenen Spermien als auch die Motilität deutlich gesunken. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Spermien nach dem Kapazitationspeak einen progressiven Verlust der Bindungsfähigkeit zeigen (Peña et al. 2004); allerdings können sowohl Spermien mit intaktem Akrosom, als auch die Spermien mit aktiviertem Akrosom, an die Zona pellucida binden (Kawakami et al. 1993).

2. Material und Methoden

Im Rahmen einer früheren Diplomarbeit (Burak und Papadopoulos 2019) waren Ejakulate mittels manueller Methode (Seager und Fletcher 1972) und fraktioniert von 17 gesunden Rüden aus verschiedenen Rassen gewonnen worden (Beagle, Golden Retriever, Deutsche Dogge, Malinois, American Staffordshire Terrier, Pudel, Weisser Schäferhund, English Setter, Kleiner Münsterländer, Border Collie, Dalmatiner). Das Alter betrug durchschnittlich 4.3 ± 3.1 Jahre. Alle Rüden waren Patienten der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Plattform Besamung und Embryotransfer und waren vor der Absamung als klinisch und andrologisch gesund befundet worden.

Abbildung 1 stellt das Versuchsschema wie von Burak und Papadopoulos (2019) beschrieben dar.

Abbildung 1: Versuchsschema (nach Burak und Papadopoulos 2019)

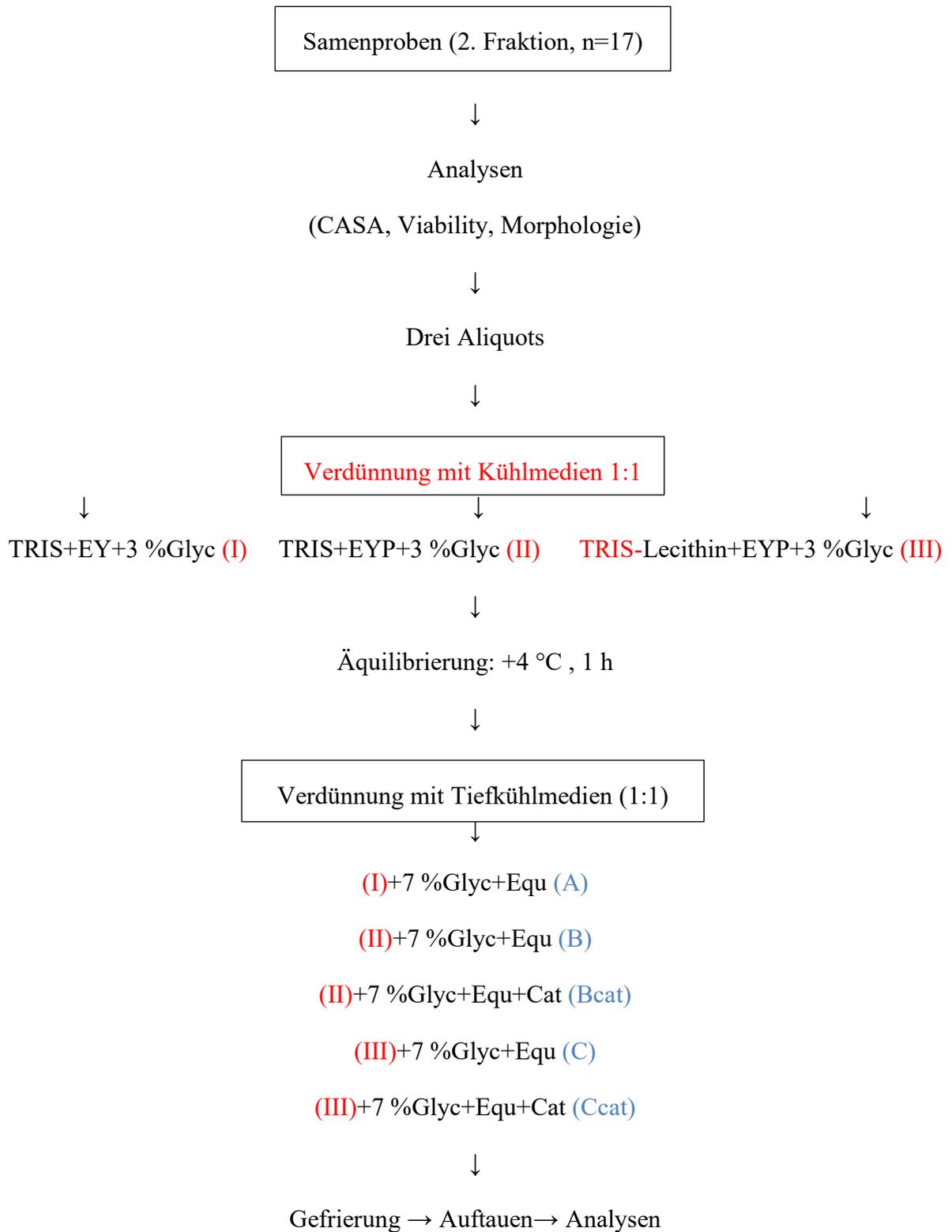


Abb. 1: Die Samenproben wurden unmittelbar nach der Untersuchung ohne Zentrifugation in drei Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden 1:1 mit Kühlmedien verdünnt (I, II, III). Das erste Aliquot wurde mit einem TRIS-Fructose-Zitronensäure (TRIS) Verdünner verdünnt, das 20 % Eigelb (EY) und 3 % Glycerol (I) enthielt. (TRIS-EY) (Schäfer-Somi und Aurich 2007). Das zweite Aliquot wurde mit dem gleichen Verdünner verdünnt, der aber 20 % Eigelbplasma (EYP) anstatt von Eidotter enthielt (TRIS- EYP) (II) (Corcini et al. 2016). Das dritte Aliquot wurde mit TRIS basiertem Lecithin Medium (Minitüb, Tiefenbach, D) verdünnt, es beinhaltete 0,8 % Lecithin, 20 % EYP und 3 % Glycerol (III). Nach der Verdünnung wurden die Proben eine Stunde bei +4 °C im Wasserbad äquilibriert. Nach diesem Schritt wurde das Tiefkühlmedium zu den Proben gemischt (1:1, Endverdünnung 1:3); die Probe (I) wurde mit dem Kühlmedium TRIS-EY angereichert, das zusätzlich 7 % Glycerol and 1 % Equex STM Paste (A) enthielt. Die Proben (II) und (III) wurden in je zwei Aliquots aufgeteilt, alle Aliquots wurde mit dem Tiefkühlmedium verdünnt, welches auch 7 % Glycerol und 1 % Equex (B und C) enthielt; das jeweils zweite Aliquot wurde zusätzlich mit 300 I.U./mL Katalase angereichert (Bcat und Ccat). Nach Abfüllung in 0,5 ml Pailletten, wurden die Proben mit einem Computer assoziierten Einfrierautomat gefroren (Schäfer-Somi et al. 2006) und bis zur Analyse im flüssigen Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit dem Computer Assisted Sperm Analyser (CASA) analysiert und ein Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) durchgeführt (Koderle et al. 2009). Weiters wurde mittels Durchflusszytometrie auf Apoptose (annexin V/PE apoptosis detection kit, BD- Pharmingen, San Diego, Ca, USA) und Sauerstoffradikale (reactive oxygen species; ROS; Färbung mit Dihydroethidium) untersucht (Burak und Papadopoulos 2019). Schließlich wurde im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit ein Zona Binding Assay (ZBA) mit einer weiteren Paillette durchgeführt.

2.1. Zona Binding Assay

2.1.1. Tiere

Die Oozyten wurden von 20 Hündinnen verschiedener Rassen gewonnen, die zur Kastration an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, Vetmeduni Wien vorstellig wurden (Mops, Mischling, Toy Pudel, West Highland White Terrier, Elo, Golden Retriever,

Labrador Retriever, Französische Bulldogge, Parson Jack Russel Terrier, Chihuahua, Pinscher, English Staffordshire Terrier, Deutscher Jagdterrier, Bolonka Zwetna, Deutscher Schäferhund, Chesapeake Bay Retriever, Havaneser). Alle Hündinnen waren vor der Kastration klinisch und gynäkologisch gesund und befanden sich zur Zeit der Kastration im späten Metöstrus oder Anöstrus. Das Alter betrug durchschnittlich $33,4 \pm 27,3$ Monate.

2.1.2. Oozytengewinnung

Die Ovarien wurden nach Ovariohysterektomie gewonnen, die an der Klinik unter Vollnarkose und nach Klinikmethode routinemäßig durchgeführt worden war. Alle Tierbesitzer haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben, dass die Gewebe im Anschluss an die Operation zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden dürfen. Die Ovarien wurden in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) bei -20 °C eingefroren und gelagert (Kmenta et al. 2011). Vor der Verarbeitung wurden die Ovarien bei Raumtemperatur aufgetaut, dann in phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und in einer Petrischale mit PBS + 0,4 % BSA (Bovine Serum Albumin) zerschnitten, um Cumulus-Oozyten-Komplexe (COCs) freizusetzen. Dieser Arbeitsschritt ist in der Abbildung 2 sichtbar. Die freigeordneten Oozyten wurden unter dem Binokular-Mikroskop (OLYMPUS U-TV0.5XC-3, 7H01027, JAPAN) untersucht und zum Waschen mittels einer Pipette in eine zweite Petrischale mit PBS + 0,4 % BSA umgesetzt. Danach wurden die Oozyten wieder in ein 5 ml Tube mit 2 ml PBS + 0,4 % BSA umgesetzt und dabei auch die Anzahl der Oozyten gezählt. Das Tube wurde 15 Minuten bei hoher Geschwindigkeit gevortext. Die gewaschenen und von Cumuluszellen befreiten Oozyten wurden bei $+4\text{ °C}$ über Nacht in PBS + 0,4 % BSA gelagert und am nächsten Tag für den ZBA verwendet. Nur die besten Oozyten mit entsprechender Größe und dunklem Nukleus wurden verwendet (Kmenta et al. 2011, Peña et al 2018). In der Abbildung 3 sind die Oozyten veranschaulicht, die die Kriterien entsprechen.

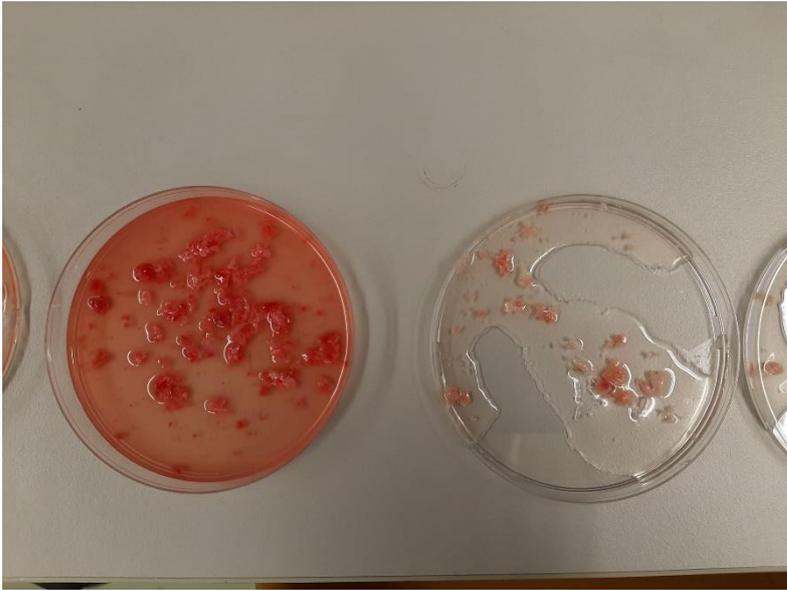


Abb. 2: Die gewaschenen und zerschnittenen Ovarien in PBS+0,4 %BSA.

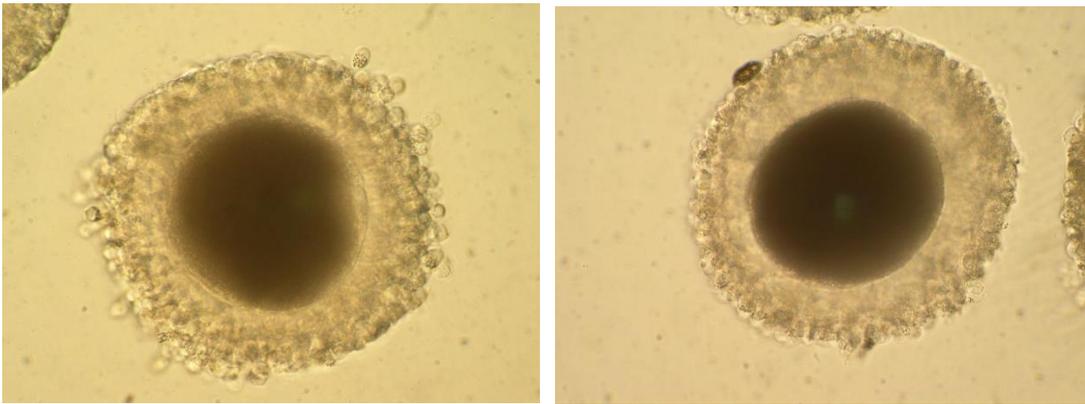


Abb. 3: Die Cumulus-Oocyten Komplexe nach 35 h und 69 h post ovulatorisch. (Bildquelle: K. Reynauld).

2.1.3. Spermiovorbereitung für den Zona Binding Assay

Die Samenproben wurden bei 38 °C über 20 Sekunden im Wasserbad aufgetaut, dann der Inhalt einer Paillette (Konzentration ca 200×10^6 /ml) zu 2 ml CCM gegeben. Nach dieser Verdünnung wurden die Spermien zweimal mit je 2 ml CCM über 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, um die Kryokonservierungsmedien zu entfernen (Peña et al. 2018). Vom resultierenden Pellet wurden 100 μ l mit 300 μ l CCM verdünnt, dann die Spermienkonzentration gemessen. Anschließend wurde so mit CCM verdünnt, dass in 5 μ l annähernd 25000 Spermien enthalten waren (Peña et al. 2018).

2.1.4. Durchführung des Zona Binding Assay

Für den ZBA wurde jeweils ein 10 μ l Tropfen von CCM in ein well einer 4-well-plate platziert, dann mit 0,5 ml Mineralöl überschichtet. Dieser Arbeitsschritt ist in Abbildung 4 gut zu sehen. Dann wurden 5-10 vollständig intakte Oozyten ausgesucht und in je einen Tropfen gesetzt und vor der Insemination bei 38.5 °C, 5 % CO₂ in Luft für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu jedem Tropfen $0,5 \times 10^6$ Spermien/ml, (25000 Spermien/5 μ l) pipettiert. Die Proben wurden bei 38.5 °C, 5 % CO₂ in Luft für 2 Stunden inkubiert (Peña et al. 2018).



Abb. 4: Für den ZBA verwendete 4-well-plate mit CCM und Mineralöl.

Anschließend wurden die Spermien-Oozytenkomplexe in 100 μ l Tropfen PBS + 1 % Polyvinylalkohol (PVA) gesetzt und kurz fixiert (Kmenta et al. 2011), nachher wurden die Spermien-Oozyten Komplexe in 100 μ l PBS + BSA gesetzt und 10x pipettiert, um lose gebundene Spermien zu entfernen. Die Färbung erfolgte mit Propidiumiodid (PI, Kmenta et al. 2011): Die Komplexe wurden in 100 μ l einer Färbelösung plaziert (5 μ l PI in 1 ml PBS, enthält 10 μ g PI) und 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Oozyten in 5 μ l Tropfen von CCM auf einen Objektträger gesetzt und mit einem Deckglas bedeckt im Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX70, Olympus Optical CO, Ltd. Japan; U-MWB filter block, BP420-480 excitation filter, BA515 suppressor filter, dichromatic mirror: DM500Vergrößerung: x400) angeschaut. Um die Spermien-Oozytenkomplexe nicht zu zerdrücken, wurde Entellan New Lösung (HX86597161, 100 ml) am Rande eines Deckglases aufgetragen, dann das Deckgläschen vorsichtig auf die Spermien-Oozytenkomplexe gesetzt. Im Mikroskop wurden dann die gebundenen Spermien gezählt und als Quotient (Spermien/Oozyte) angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Canine Capacitation Mediums (Mahi und Yanagimachi, 1978)

Komponente	g/l	mM
NaCl	4,880	83,49
KCl	0,356	4,78
CaCl ₂	0,189	1,71
KH ₂ PO ₄	0,162	1,19
NaHCO ₃	3,159	37,61
Na Pyruvat	0,028	0,25
Na Lactat 60 % Sirup	3,38 ml	21,55
Glucose	0,500	2,78
Bovines Serum Albumin	2,000	
Phenolrot	0,020	
Streptomycin Sulfat	0,050	
K-penicillin G	100,000 units	
pH unter 5 % CO ₂ in der Luft		7,8
Osmolarität		302 mOsm

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -18 °C gelagert.

2.2. Statistik

Für die statistischen Berechnungen wurde ein IBM SPSS Statistik Programm verwendet (version 24, Armonk, NY, USA). Zunächst wurde ein Kolmogorov-Smirnov Test zur Untersuchung auf Normalverteilung angewendet. Nachdem keine Normalverteilung vorlag, wurde der nicht-parametrische Friedman Test zur Feststellung signifikanter Differenzen zwischen den Gruppen angewendet und zur Berechnung der Differenz zwischen zwei Gruppen der Mann-Whitney-U Test. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

Die Diplomarbeit von Burak und Papadopoulos (2019) zeigte deutlich, dass die Proben mit Eidotter bessere Qualität nach dem Auftauen zeigten, als jene mit Eidotterplasma, Lecithin oder Katalase. Nach dem Auftauen zeigte (A) eine signifikant bessere progressive Motilität als alle anderen Proben, allerdings betrug die progressive Motilität immer >50 %. Die velocity curvilinear (VCL) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Die Proben mit Eidotter zeigten außerdem den geringsten Prozentsatz an ROS, den geringsten Prozentanteil an Akrosomschäden und den höchsten Prozentanteil an intakten Zellen (Burak und Papadopoulos 2019). Die Viability war ohne signifikante Differenz zwischen den Proben mit Eidotter und jenen mit EYP, aber die Beimengung von Katalase und beide Lecithin Medien verminderten die Werte im Vergleich zum Eidotterverdünner signifikant. Der Anteil an DNA Fragmentation und morphologischen Abweichungen war nicht signifikant zwischen den Gruppen. Die meisten toten Zellen waren in den Proben mit Lecithin und Katalase vorhanden. Bei Verwendung von Eidotterplasma anstelle von Eidotter stieg der Prozentsatz an spät apoptotischen Zellen und ROS signifikant an (A vs B: $p < 0.01$).

Bei Betrachtung der Ergebnisse des ZBA fällt auf, dass die Proben mit den verschiedenen Verdünnungsmedien keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der in-vitro Bindungsfähigkeit aufwiesen. Die Proben zeigten aber innerhalb der Gruppen große Streuung. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5 dargestellt.

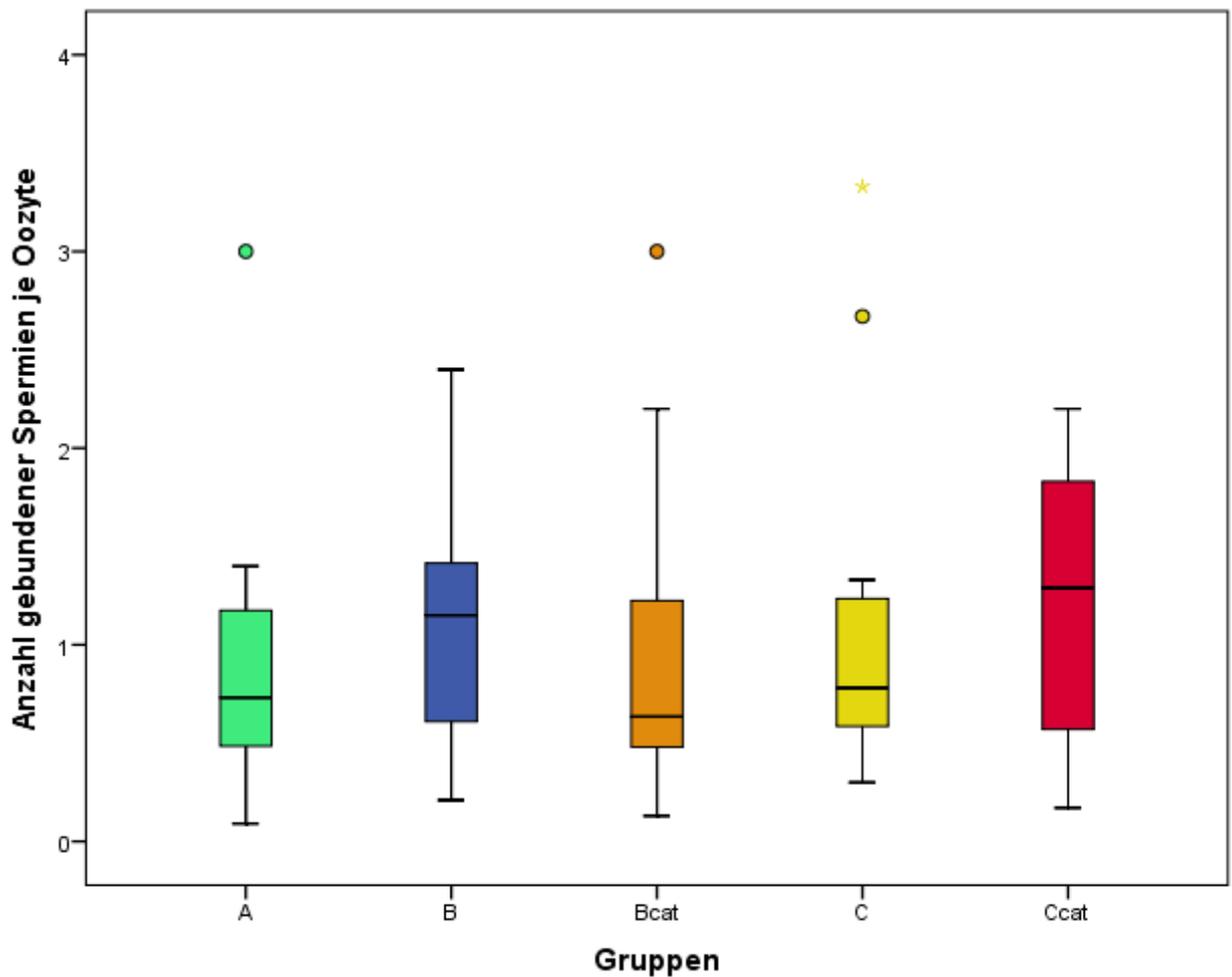


Abbildung 5: X Ergebnisse des Zona binding assay (ZBA). Box and Whisker Plot, der die Anzahl der gebundenen Spermatozyten pro Oocyte in den Gruppen mit verschiedenen Verdünnern zeigt (die Werte sind Quartile).

A = TRIS-citric acid-fructose Verdünner mit Eidotter, Glycerol und Equex STM Paste.

B = TRIS-citric acid-fructose Verdünner mit Eidotterplasma, Glycerol und Equex STM Paste.

Bcat = TRIS-citric acid-fructose Verdünner mit Eidotterplasma, Glycerol, Equex STM Paste und Catalase.

C = Lecithin Verdünner mit Eidotterplasma, Glycerol und Equex STM Paste.

Ccat = Lecithin Verdünner mit Eidotterplasma, Glycerol, Equex STM Paste and Catalase.

4. Diskussion

Das wesentliche Ergebnis dieser Studie war, dass die verschiedenen Verdünnungsmedien, die in der Studie verwendet wurden, keinen signifikanten Unterschied bezüglich der in-vitro Bindungsfähigkeit gezeigt haben. Die Ergebnisse der Diplomarbeit von Burak und Papadopoulos (2019) zeigten deutlich, dass die Proben mit Eidotter eine bessere Spermienqualität aufweisen konnten. Diese Proben zeigten bessere progressive Motilität als die anderen Proben, den höchsten Prozentsatz an intakten Zellen und den geringsten Prozentsatz an Akrosomschäden. Außerdem wurden in diesen Proben signifikant weniger ROS nachgewiesen. Der Ersatz von Eidotter durch Eidotterplasma führte zu einem signifikanten Anstieg des Prozentsatzes an spät apoptotischen Zellen und ROS; alle anderen Parameter blieben jedoch vergleichbar, so dass die Samenqualität nach dem Auftauen ohne die Untersuchung auf Apoptose und ROS als gut zu bezeichnen wäre.

In einer Studie von Corcini et al. (2016) wurde untersucht, ob sich Tiefkühlverdünner mit EYP besser oder zumindest gleich gut zur Tiefgefrierung von kaninen Spermien eignen wie jene mit Eigelb. Die Spermien mit Zusatz von 20 % EYP im Verdünner zeigten nach dem Auftauen eine bessere Membran-, Akrosomenintegrität und Motilität. Die Morphologie der Spermien war mit beiden Substanzen vergleichbar. Apoptose, und ROS wurden in dieser Studie nicht untersucht, es wurde kein Zona binding assay durchgeführt. Auch in unserer Studie waren die kinetischen Parameter in den Proben mit EYP nach dem Auftauen relativ gut und vergleichbar mit den Ergebnissen von Corcini et al (2016), die VCL war gleich gut wie in den Proben mit Eidotter; aber die Proben mit Eidotter zeigten in der Studie von Corcini et al (2016) eine erstaunlich schlechte Motilität, v. a., da ein ganz ähnlicher Verdünner verwendet wurde, woraus sich das signifikant bessere Ergebnis mit den EYP Proben ergibt. Erklärt werden kann das teilweise damit, dass in der Studie von Corcini et al (2016) keine Equex STM Paste verwendet wurde. Diese Paste hat in anderen Studien mit TRIS-basierten, eidotterhaltigen Tiefkühlmedien einen positiven Effekt auf alle kinetischen Parameter, die Akrosomintegrität und die Viability der Samenzellen gezeigt (Rota et al 1997, Peña und Linde-Forsberg 2000).

Unsere Arbeit zeigt zum ersten Mal auf, dass die Bindungsfähigkeit durch EYP nicht beeinträchtigt wird. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Eidotter eine positive Wirkung

auf die Bindungsfähigkeit der Spermien hat. Humane Spermien, die bei Raumtemperatur 2 Stunden in eidotterhaltigem Medium inkubiert wurden, zeigten im Hemizona Assay eine bessere Bindungsfähigkeit, als die Spermien im Medium ohne Eidotter. Dieses Ergebnis wurde mit der Hypothese begründet, dass die Lipide in dem Eidotter die Spermienmembran stabilisieren, eine synchronisierte Kapazitation ermöglichen und eine frühzeitige Akrosomreaktion verhindern, wodurch mehr Spermien an die Zona Pellucida binden können (Gamzu et al. 1994). Die Verhinderung der vorzeitigen Akrosomreaktion von Samenzellen wurde auch von Witte et al. (2009) als positiver Effekt des Eidotters festgestellt, was vermutlich auch auf EYP zutrifft. In der Studie von Burak und Papadopoulos (2019) wurde als Schlussfolgerung bemerkt, dass EY durch EYP im TRIS-Fruktose-Zitronensäure Tiefkühlmedium ausgetauscht werden kann. Jedoch wurde diskutiert, ob die erhöhte ROS Konzentration, die in den EYP Proben vorhanden war, einen negativen Effekt auf die in-vitro Bindungsfähigkeit hat oder nicht. Diese Frage konnte in unserer Studie beantwortet werden, denn es konnte kein signifikanter Unterschied in der Bindungsfähigkeit zwischen den Proben mit EY und EYP festgestellt werden; wie die in-vivo Bindungsfähigkeit ausfällt kann aber nur eine Besamungsstudie aufzeigen.

Antioxidantien werden dem Kryokonservierungs-Medium zugesetzt, um eine Qualitätsminderung der Samenproben durch einen unphysiologischen Anstieg an ROS zu verhindern. Um dieses Ziel zu erreichen, stehen verschiedene Antioxidantien zur Verfügung. Beccaglia et al. (2009) untersuchten die Wirkung von verschiedenen Katalasekonzentrationen (150 und 450 UI/ml) im TRIS-Verdünner mit 0,04 % Lecithin. Katalase beeinflusste in den untersuchten Konzentrationen nach viertägiger Kühlung die Spermienkinetik und -morphologie nicht positiv, aber die Zugabe von 150 UI Katalase/ml führte zu einer besseren Bindungsfähigkeit im Vergleich zu Proben mit Verdünnern ohne Katalase. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Kmenta et al. (2011) überein, die den gleichen TRIS-Verdünner, die gleiche Katalasekonzentration aber höhere Lecithinkonzentrationen (0,8 %) zur Kühlung von Hundespermien verwendeten. Wie bei Beccaglia et al (2009) wiesen die Proben mit Lecithin und Katalase eine bessere Bindungsfähigkeit auf, als die Proben mit Eidotter oder die Proben mit Lecithin ohne Katalase.

Im aufgetauten Tiefkühlsamen wurde der Effekt von Katalase auf die Bindungsfähigkeit der Samenzellen bisher nicht untersucht. Michael et al. (2007) haben die Wirkung mehrerer Antioxidantien (Vitamin C, N-Acetyl-L-Cystein, Taurin, Katalase, Vitamin E, B16) in einem Tiefkühl-Verdüner auf TRIS-EY Basis getestet. Der Zusatz von Katalase wirkte sich positiv auf Motilität, Lebensfähigkeit und Morphologie aus. Der Effekt auf die Bindungsfähigkeit wurde nicht untersucht. In der Studie von Burak und Papadopoulos (2019) hatte Katalase keinen positiven Einfluss auf die Spermienkinetik, die Motilität war sogar schlechter in den Proben, die Katalase enthielten, obwohl die gleiche Endkonzentration verwendet wurde. Die Membranintegrität und die Akrosomintaktheit wurde auch nicht positiv beeinflusst. Das könnte einerseits mit der von uns verwendeten Charge erklärt werden. Andererseits reduziert Katalase die Bildung von H₂O₂. Vermutlich war die Menge an H₂O₂ in den Proben so gering, dass die Katalase Wirkung unerheblich war. In unserer Studie war jedenfalls die Bindungsfähigkeit der Proben mit Katalase weder besser noch schlechter als jene von Proben ohne Katalase. In einer Folgestudie sollte trotzdem ein anderes Antioxidans verwendet werden, das bei Verwendung von EYP effizienter die Menge an ROS senken kann.

Lecithin-Verdüner werden seit längerem zur Konservierung von Hundespermien erprobt. Die Konzentration und die Art des Lecithins (Paz et al. 2010) erwiesen sich als wesentliche Parameter für das Ergebnis. Axnér und Lagerson (2016) zeigten, dass Proben mit 1 oder 2 % Lecithin im Verdüner keine bessere Samenqualität zeigten als jene mit Eidotter-Verdüner. Vermutlich da eine Lecithinkonzentration über 1 % zu erhöhter Viskosität und zu erniedrigter Viability und Motilität führen kann, was bei Schafbocksamen beobachtet wurde (Forouzanfar et al. 2010). In unser Studie wurde der Lecithin Verdüner, der 0,8 % Lecithin enthielt, mit 20 % EYP ergänzt, trotzdem konnte keine bessere Spermienqualität erreicht werden, auch nicht durch Katalasezusatz. Vermutlich senkte die insgesamt gesteigerte Menge an Lecithin hauptsächlich die Mitochondrienaktivität und damit die Zellkinetik. Die Bindungsfähigkeit an die Zona pellucida war in den Proben mit Lecithin-Verdüner jedoch nicht signifikant schlechter.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in dieser Studie das Eidotterplasma gemeinsam mit der Equex STM Paste die Bindungsfähigkeit nicht änderte; die Zellkinetik und Akrosomintegrität waren ausreichend. Das gleiche traf aber auch auf die Lecithin-hältigen

Verdüner zu und war unabhängig vom Katalasezusatz. Offensichtlich waren in allen Proben genug intakte, vitale und progressive Spermien enthalten, zumindest für diesen in-vitro assay. Ob die in-vivo Befruchtungsfähigkeit der Proben mit den verschiedenen Verdünnern vergleichbar ist, muss weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die Effekte von Eigelb und Eidotterplasma sowie von Katalase in verschiedenen Tiefkühlverdünnern zur Samentiefgefrierung von Hunden zu untersuchen. In der Diplomarbeit von Burak und Papadopoulos (2019) wurden Samenproben von 17 gesunden Rüden verschiedener Rassen gewonnen, tiefgefroren und nach dem Auftauen auf kinetische Parameter, Viability, Morphologie, Apoptose, Reactive oxygene species (ROS) und DNA Schäden untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die gleichen Proben auf ihre Bindungsfähigkeit an kanine Oozyten untersucht.

Die fraktionierte Samengewinnung wurde bei jedem Hund einmal durchgeführt, nach einer Qualitätsüberprüfung wurden die Samenproben ohne Zentrifugation in drei Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden mit Kühlmedien verdünnt (I, II, III), danach wurden die Proben eine Stunde bei +4 °C im Wasserbad äquilibriert und dann das Tiefkühlmedium dazu gemischt (1:1, Endverdünnung 1:3). Die Probe A enthielt TRIS- Fructose-Zitronensäure Verdünner mit Eidotter, Glycerol und Equex STM Paste. Die Probe B enthielt die gleiche Komponente, aber statt Eidotter wurde Eigelbplasma verwendet. Bei der Probe C wurde ein TRIS-Lecithin Verdünner mit Eidotterplasma, Glycerol und Equex STM Paste verwendet. Das jeweils zweite Aliquot von Probe B und C wurde zusätzlich mit 300 I.U./mL Katalase angereichert (Bcat und Ccat). Nach Abfüllung in 0,5 ml Pailletten, wurden die Proben mit einem Computer assoziierten Einfrierautomat gefroren (Schäfer-Somi et al. 2006) und bis zur Analyse im flüssigen Stickstoff gelagert.

Nach dem Auftauen wurde eine Samenprobe mittels Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) untersucht sowie eine weitere mittels Durchflusszytometrie auf DNA Schäden (Sperm Chromatin Structure Assay; SCSA), reactive oxygen species (ROS) und Apoptose. Mit dem Samen einer weiteren Paillette wurde ein Zona Binding Assay (ZBA) durchgeführt.

Die Proben mit Eidotter und Equex STM Paste zeigten eine bessere progressive Motilität (P), den höchsten Prozentsatz an intakten Zellen und den geringsten Prozentanteil an Akrosomschäden und signifikant weniger ROS ($p < 0.05$ bzw $p < 0.01$). Die Proben mit Katalase und Lecithin und Equex STM Paste waren nicht besser, sie enthielten die meisten

toten Zellen. Ersatz von Eidotter durch Eidotterplasma erhöhte die Zahl der Zellen mit später Apoptose und die ROS signifikant (Burak und Papadopoulos 2019).

In unser Studie zeigten die Proben mit verschiedenen Verdünnungsmedien keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Bindungsfähigkeit.

Die Schlussfolgerung ist, dass ein Zwei-Phasenverdünner mit TRIS-EY, Glycerol und Equex STM Paste (A) besser hinsichtlich P, Viability, ROS und Apoptose war, als die anderen Tiefkühl-Medien. Die Ergebnisse von TRIS-EYP mit Glycerol und Equex STM Paste waren ähnlich, allerdings waren mehr ROS und apoptotische Zellen nachweisbar. Die in-vitro Bindungskapazität und VCL waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Anscheinend waren genügend motile und Membran-intakte Zellen vorhanden, um die Bindung zu gewährleisten. Die Fertilisationskapazität dieser Verdünnungsmedien muss jedoch in-vivo untersucht werden.

6. Summary

The aim of this study was to assess the effects of egg yolk, egg yolk plasma and catalase in different freezing extenders on frozen-thawed semen in dogs. In the study of Burak und Papadopoulos (2019), semen samples (main fraction) were collected from 17 healthy dogs of different breeds. The samples were frozen, and after thawing, the quality of the samples was analyzed and parameters like kinetics, viability, morphology, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) and DNA damage evaluated. In this study, the in-vitro binding ability of the previously mentioned samples was examined.

Fractionated semen collection was done once from each of the dogs. After quality evaluation of the specimens, they were divided without centrifugation into three aliquots. The aliquots were diluted 1:1 with cooling extender (I, II, III), afterwards the samples were equalibrated for one hour in a water bath at +4 °C, then the freezing extender was added (1:1, final dilution rate 1:3). Sample A contained TRIS-fructose-citric acid extender with egg yolk, glycerol and Equex STM Paste. Sample B contained the same components, but egg yolk plasma was used, instead of egg yolk. In sample C, a TRIS –based lecithin extender was used with egg yolk plasma, glycerol and Equex STM Paste. The second aliquots of sample B and C were enriched with 300 I.U./mL catalase (Bcat and Ccat). After filling in 0,5 ml straws the samples were frozen in a computer-assisted freezing automat (Schäfer-Somi et al 2006) and stored in liquid nitrogen until analysis.

After thawing, a computer assisted sperm analyser (CASA) was used for quality assessment. Furthermore, flow cytometry was used for a sperm chromatin structure assay (SCSA) and examination for ROS and apoptosis. Finally, a Zona Binding Assay (ZBA) was done with semen from one more straw.

The samples with egg yolk and Equex STM Paste showed better progressive motility (P), the highest percentage of intact cells and the lowest percentage of acrosome damage and significant less ROS ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) than the other samples. The samples with catalase and lecithin were not better, the amount of dead cells were at maximum. The replacement of egg yolk with egg yolk plasma increased the number of cells with late apoptosis and the ROS significantly (Burak und Papadopoulos 2019).

In our study the samples with different extenders showed no significant difference in their binding ability.

The final conclusion is that a two-phase freezing medium with TRIS-EY, glycerol and Equex STM paste (A) is better with regards to P, viability, ROS and apoptosis. The results of TRIS-EYP, glycerol and Equex STM Paste were similar, though more ROS and apoptotic cells were detected.. In-vitro binding ability and VCL did not differ significantly between groups. Apparently there were enough motile and membrane intact cells to achieve binding. The fertilizing capacity of the extenders should be examined in-vivo.

7. Literaturverzeichnis

Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.*, 41(1):183-97. DOI: 10.1095/biolreprod41.1.183.

Alvarez JG, Storey BT. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.*, 42(3):334-46. DOI: 10.1002/mrd.1080420311.

Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. 2008. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol.*, 52(5-6):463-72. DOI: 10.1387/ijdb.072555ea.

Axnér E, Lagerson E. 2016. Cryopreservation of Dog Semen in a Tris Extender with 1 % or 2 % Soya Bean Lecithin as a Replacement of Egg Yolk. *Reprod Domest Anim.*, 51(2):262-8. DOI: 10.1111/rda.12675.

Beccaglia M, Anastasi P, Chigioni S, Luvoni GC. 2009. Tris-Lecithin Extender Supplemented With Antioxidant Catalase for Chilling of Canine Semen. *Reprod Domest Anim.*, 44 Suppl 2:345-9. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01410.x.

Bergeron A, Crête M-H, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod.*, 70(3):708-17. DOI: 10.1095/biolreprod.103.022996.

Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology.*, 1;50(5):699-706. DOI: 10.1016/s0093-691x(98)00175-7.

Burak J, Papadopoulos N. 2019. Einfluss zweier Tiefkühlmedien auf die Apoptose caniner Spermatozoenmembranen und auf die reactive oxygen species (ROS) im Tiefkühlsamen von Rüden [Diplomarbeit]. Wien: Veterinärmedizinischen Universität Wien

Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.*, 59(4):451-8. DOI: 10.1002/mrd.1052.

Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science.*, 281(5384):1857-9. DOI: 10.1126/science.281.5384.1857.

Chłopik A, Wysokińska A. 2020. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reprod Domest Anim.*, 55(2):113-126. DOI: 10.1111/rda.13596.

Corcini CD, Goularte KL, Bongalhardo DC, Lucia T, Jardim RD, Varela Junior AS. 2016. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia.*, 48(1):114-5. DOI: 10.1111/and.12411.

Dalmazzo A, Losano JDA, Rocha CC, Tsunoda RH, Angrimani DdSR, Mendes CM, Assumpção MEODÁ, Nichi M, Barnabe VH. 2018. Effects of Soy Lecithin Extender on Dog Sperm Cryopreservation. *Anim Biotechnol.*, 29(3):174-182. DOI: 10.1080/10495398.2017.1334662.

Dathe M, Schumann M, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M. 1996. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry.*, 35(38):12612-22. DOI: 10.1021/bi960835f.

Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *J Biol Chem.*, 278(9):7001-9. DOI: 10.1074/jbc.M206284200.

- Evans Janice P. 1999. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci.*, 4:D114-31. DOI: 10.2741/evans.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.*, 73(4):480-7. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.005.
- Gamzu R, Yavetz H, Lichtenberg D, Paz G, Homonnai ZT and Yogev Y. 1994. The effect of egg yolk on the binding capacity of human spermatozoa to zona pellucida. *Fertil Steril.*, 62(6):1221-5. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)57189-1.
- Griveau JF, Le Lannou D. 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl.*, 20(2):61-9. DOI: 10.1046/j.1365-2605.1997.00044.x.
- Hermansson U, Ponglowhapan S, Forsberg CL, Ström Holst B. 2006. A short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog. *Theriogenology.*, 66(4):717-25. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.043.
- Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. 2006. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem.*, 281(9):5623-33. DOI: 10.1074/jbc.M508172200.
- Hishinuma M, Minami S, Okamoto Y, Miyatake K, Sekine J. 2004. Recovery, morphological quality, and in vitro maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. *Theriogenology.*, 62(9):1652-62. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.03.009.
- Ikawa M, Nakanishi T, Yamada S, Wada I, Kominami K, Tanaka H, Nozaki M, Nishimune Y, Okabe M. 2001. Calmegin is required for fertilin α/β heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol.*, 240(1):254-61. DOI: 10.1006/dbio.2001.0462.

- Ivanova M, Mollova M, Ivanova-Kicheva MG, Petrov M, Djarkova T, Somlev B. 1999. Effect of cryopreservation of zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology.*, 52(1):163-70. DOI: 10.1016/s0093-691x(99)00118-1.
- Kaskar K, Franken DR, van der Horst G, Oehniger S, Kruger TF, Hodgen GD. 1994. The relationship between morphology, motility and zona pellucida binding potential of human spermatozoa. *Andrologia.*, 26(1):1-4. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1994.tb00744.x.
- Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Overstreet JW. 1993. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol Reprod.*, 48(4):841-5. DOI: 10.1095/biolreprod48.4.841.
- Kmenta I, Strohmayer C, Müller-Schlösser F, Schäfer-Somi S. 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology.*, 75(6):1095-103. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.11.018.
- Koderle M, Aurich C, Schäfer-Somi S. 2009. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. *Theriogenology.*, 72(9):1215-20. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.07.015.
- Mahadevan MM, Trounson AO, Wood C, Leeton JF. 1987. Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes inseminated in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transf.*, 4(4):223-7. DOI: 10.1007/BF01533760.
- Mahi CA, Yanagimachi R. 1978. Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Research.*, <https://doi.org/10.1002/mrd.1120010203>.
- Mayenco-Aguirre AM, Pérez Cortés AB. 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology.*, 50(2):195-204. DOI: 10.1016/s0093-691x(98)00126-5.

- Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscos C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology.*, 68(2):204-12. DOI:10.1016/j.theriogenology.2007.04.053.
- Mulgrew-Nesbitt A, Diraviyam K, Wang J, Singh S, Murray P, Li Z, Rogers L, Mirkovic N, Murray D. 2006. The role of electrostatics in protein–membrane interactions. *Biochim Biophys Acta.*, 1761(8):812-26. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2006.07.002.
- Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. 2004. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem.*, 279(33):34957-62. DOI: 10.1074/jbc.M314249200.
- Nizański W, Dubiel A, Bielas W, Dejneka GJ. 2001. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J Reprod Fertil Suppl.*, 57:365-9.
- Paz P de, Estes MC, Alvarez M, Mata M, Chamorro CA, Anel L. 2010. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology.*, 74(4):663-71. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.03.022.
- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology.* 54(6):859-75. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00397-6.
- Peña Ana I, Adán Sheila, Quintela Luis A, Becerra Juan J, Herradón Pedro G. 2018. Relationship between motile sperm subpopulations identified in frozen-thawed dog semen samples and their ability to bind to the zona pellucida of canine oocytes. *Reprod Domest Anim.*, 53 Suppl 3:14-22. DOI: 10.1111/rda.13349.
- Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C. 2001. Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl.*, 57:371-6.

Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG. 2004. Zona pellucida binding ability and responsiveness to ionophore challenge of cryopreserved dog spermatozoa after different periods of capacitation in vitro. *Anim Reprod Sci.*, 84(1-2):193-210. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2003.11.007.

Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction.*, 130(2):193-201. DOI: 10.1530/rep.1.00500.

Rodriguez-Martinez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.*, 47:279-85.

Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 degrees C. *Theriogenology.*, 47(5):1093-101. DOI: 10.1016/s0093-691x(97)00066-6.

Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken R J. 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res.*, 529(1-2):21-34. DOI: 10.1016/s0027-5107(03)00101-5.

Schäfer-Somi S, Aurich C. 2007. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim Reprod Sci.*, 102(1-2):1-13. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.03.019.

Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology.*, 66(2):173-82. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.10.022.

Seager SW, Fletcher WS. 1972. Collection, storage, and insemination of canine semen. *Laboratory animal science*, 22(2):177-82.

Thomassen R, Sanson G, Krogenaes A , Fougner JA, Andersen Berg K, Farstad W. 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a

non-surgical approach. *Theriogenology.*, 66(6-7):1645-50. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.022.

Ulrich AS, Otter M, Glabe CG, Hoekstra D. 1998. Membrane fusion is induced by a distinct peptide sequence of the sea urchin fertilization protein bindin. *J Biol Chem.*, 273(27):16748-55. DOI: 10.1074/jbc.273.27.16748.

Vacquier VD, Moy GW. 1977. Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(6):2456-60. DOI: 10.1073/pnas.74.6.2456.

Vieira NdMG, Losano JDdA, Angrimani DdSR, Kawai GKV, Bicudo LdC, Rui BR, da Silva BdCS, Assumpção MEOD'A, Nichi M. 2018. Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology.*, 108:39-45. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020.

Whited AM, Johs A. 2015. The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes. *Chem Phys Lipids.*, 192:51-59. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2015.07.015.

Witte TS, Schäfer-Somi S, Kuchar A, Möstl E, Iben C, Aurich C. 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, 110(3-4):293-305. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.022.

Yanagimachi R, Usui N. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res.*, 89(1):161-74. DOI: 10.1016/0014-4827(74)90199-2.

Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiko K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M. 2009. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biol Reprod.*, 81(1):142-6. DOI: 10.1095/biolreprod.108.074021.

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsschema.....	9
Abbildung 2: Zerschnittene Ovarien	12
Abbildung 3: Oozyten.....	12
Abbildung 4: Oozyten in 4-well plates	14
Abbildung 5: X Ergebnisse des Zona binding assay (ZBA).....	18
Tabelle 1: Zusammensetzung des Canine Capacitation Mediums	15